



A Hologic Company

iDeal ChIP-seq kit for Transcription Factors

Cat. No. C01010054 (10 rxns)

C01010055 (24 rxns)

C01010170 (100 rxns)



実験を始める前に、このマニュアル
をよくお読み下さい

目次

はじめに	4
キットの概要と所要時間	5
構成品	6
本キット以外に用意するもの	7
始める前の注意点	9
プロトコル	15
ライブラリー調製とシーケンシング	33
ChIP-seq データ分析	34
実験結果の例	37
クロマチン断片化分析のプロトコル	39
FAQ	42
関連製品	46



はじめに

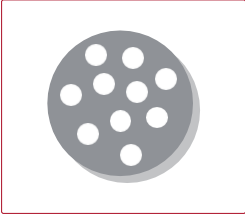
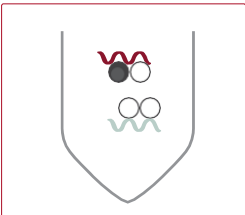
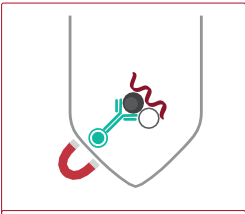
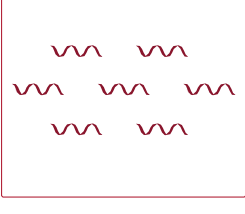
タンパク質とDNAは、遺伝子転写、エピジェネティックサイレンシング、および多くの重要な細胞機能を制御する機構に大きな影響を与えています。そのためこれらの相互作用、およびそれらが遺伝子調節経路および細胞増殖を制御または誘導する機構を理解することは重要です。クロマチン免疫沈降（ChIP）は、特定のゲノム領域とのタンパク質の相互作用を分析する技術です。ChIPは、エピジェネティックな特性やクロマチン再構成、特定のゲノム領域に結合する転写調節因子の変化などを研究するために使用することができます。

iDeal ChIP-seq kit for Transcription Factors は、細胞および組織をサンプルとし、クロマチンに作用する転写因子などのタンパク質を研究するために適した実験キットです。このプロトコルでは、まずはホルムアルデヒドによりタンパク質と-DNAを架橋し、細胞溶解の後、架橋されたクロマチンの断片化を行います。その後のクロマチンの免疫沈降は、標的タンパク質に特異的な抗体（ユーザーが指定する）を用います。プロテインA磁気ビーズを用いて目的のタンパク質-DNA複合体を単離した後、免疫沈降したDNAを、独自のIPure磁気ビーズを用いて溶出および精製します。溶出されたDNAは、qPCR分析およびChIP-seqライブラリー調製に適しています。さらにキットには、ネガティブ（IgG）およびポジティブ（CTCF）コントロール抗体およびCTCFポジティブおよびネガティブ遺伝子座を増幅するプライマー対が含まれています。

本キットが持つ優れた点は以下の通りです：

- 細胞および組織どちらからでも、最適化されたChIP-seqを行うことができます
- 入手可能なキットが最も豊富です（コントロール抗体およびプライマーを含むすべてのステップをカバーします）
- 複数の転写因子と非ヒストンターゲットを含むChIP-seqで検証済みです
- 磁気ビーズを使用することで、高速で再現性の高い簡単なChIPを行うことができます
- 当社のChIP用抗体を組み合わせることにより、優れた特異性と感度で高い収量を得ることができます
- 溶出されたDNAはqPCRおよびライブラリー調製いずれにも適しています
- わかりやすいプロトコルを提供します

キットの概要と所要時間

			必要な時間	日にち
STEP 1		細胞および組織採取、 DNA-タンパク質架橋 反応	30 分	1
STEP 2		細胞溶解およびクロ マチンの断片化	1 — 2 時間	1
STEP 3		磁気による免疫沈降	一夜	1-2
STEP 4		溶出、脱架橋およびDNA 精製	5 時間	2
STEP 5	 qPCR	ライブラリー調製、次世代 シーケンシングの前に行う 定量PCRおよびデータ解析	2 — 3 時間	2

LEGEND



Other protein



DNA

Antibody



Magnetic bead

Magnet

構成品

iDeal ChIP-seq kit for Transcription Factors には、クロマチン調製物、クロマチン免疫沈降およびDNA精製を、表1に記載されている回数分を行うのに十分な試薬が含まれています。各クロマチンのバッチのクロマチンサイズ評価用試薬も含まれています。

表1. 各キットごとの反応数

カタログ番号	クロマチンバッチ	ChIP反応の数	DNA精製の数
C01010054	2	10	14
C01010055	4	24	32
C01010170	17	100	134

キットの内容は表2に記載されています。本キットを受けとった後は、示された温度で内容物を保管してください。

表2. 本キットの構成品

内容	容量 (x10)	容量(x24)	容量 (x100)	保管温度
Protease inhibitor cocktail	38 µl	80 µl	325 µl	-20°C
5% BSA (DNA free)	380 µl	800 µl	3.25 ml	-20°C
Rabbit IgG	4 µg	8 µg	35 µg	-20°C
ChIP-seq grade CTCF antibody	4 µg	8 µg	35 µg	-20°C
ChIP-seq grade H19 imprinting control region primer pair	42 µl	96 µl	400 µl	-20°C
ChIP-seq grade Myoglobin exon 2 primer pair	42 µl	96 µl	400 µl	-20°C
Carrier	32 µl	72 µl	300 µl	-20°C
Glycine	4.4 ml	8.8 ml	38 ml	4°C
Shearing Buffer iS1b	3.4 ml	6.7 ml	29 ml	4°C

DiaMag protein A-coated magnetic beads	300 µl	720 µl	3 ml	4°C凍結不可
Wash buffer iW1	3.5 ml	8.4 ml	35 ml	4°C
Wash buffer iW2	3.5 ml	8.4 ml	35 ml	4°C
Wash buffer iW3	3.5 ml	8.4 ml	35 ml	4°C
Wash buffer iW4	3.5 ml	8.4 ml	35 ml	4°C
ChIP-seq grade water	14 ml	26,6 ml	110 ml	4°C
Elution Buffer iE2	64 µl	144 µl	600 µl	4°C
Fixation buffer	4 ml	8 ml	34 ml	4°C
Wash buffer 1 w/o iso-propanol	900 µl	2 ml	8 ml	4°C
Wash buffer 2 w/o iso-propanol	900 µl	2 ml	8 ml	4°C
Buffer C	700 µl	1.6 ml	6.7 ml	4°C
IPure Beads v2	180 µl	400 µl	1.67 ml	4°C 凍結不可
Elution Buffer iE1	1,5 ml	3.4 ml	14.5 ml	4°C
5x ChIP Buffer iC1b	3.4 ml	6.9 ml	29 ml	4°C
Lysis Buffer iL1b	50 ml	100 ml	425 ml	4°C
Lysis Buffer iL2	30 ml	60 ml	255 ml	4°C

本キット以外に用意するもの

道具および試薬類

- 手袋（全行程で着用すること）
- RNase/DNase-free 1.5 ml チューブ
- ホルムアルデヒド, 37%, 分子生物学用
- Phosphate buffered saline (PBS) buffer
- 100% イソプロパノール
- qPCR SYBR® Green Mastermix
- ChIP/ ChIP-seq grade 抗体 – www.diagenode.com
- 蛍光原理を利用するDNA濃度測定機器
e.g. the Qubit High Sensitivity assay (Life Technologies #Q32851)



- 細胞スクレーパー (接着細胞用)

組織採取をする場合に必要なもの:

- Protease inhibitor cocktail (Diagenode, Cat. No. C12010011 or C12010012) (100 µl per chromatin preparation)
- ダウンス型ホモジナイザー (隙間の緩いペストルと狭いペストル) (2 ml)
- 外科用メス
- ペトリ皿

装置類

- DiaMag 1.5 magnetic rack (Diagenode, Cat. No. B04000003)
- Picoruptor遠心機器 と専用チューブ:
 - Picoruptor (Diagenode, Cat.No.B01060001) 及び 1.5 ml PicoruptorMicrotubes with Caps (Cat.No.C30010016)
- 1.5 ml, 15 ml 及び 50 ml チューブに対応する冷却遠心機
- DiaMag Rotator (Rotating wheel) (Diagenode, Cat.No.B05000001)
- ボルテックス
- Thermomixer
- Qubit® Fluorometer (ThermoFisher Scientific)
- qPCR cycler

オプション

- Chromatin Shearing Optimization kit - Low SDS (iDeal Kit for TFs) (Diagenode, Cat. No. C01020013)
- 1M Sodium butyrate (NaBu) (Diagenode, Cat. No. C12020010)
- ChIP Cross-link Gold (Diagenode, Cat. No. C01019027)
- RNase cocktail (e.g. Ambion, AM2286A), クロマチンの断片化評価に必要
- MicroPlex Library Preparation™ kit v2 (Diagenode, Cat. No. C05010012, Cat. No. C05010013, Cat. No. C05010014) または
- iDeal Library Preparation Kit x24 (incl. Index Primer Set 1) (Diagenode, Cat. No. C05010020)

始める前の注意点

1. 細胞数

このプロトコルでは、6つ回分のIP反応と、1つのインプットサンプルおよび1つの断片化クロマチンせん断の評価をの各1サンプルずつ行うために十分な約2500万個の細胞からのクロマチンサンプルのバッチ調製量を記載しています。この標準プロトコルでは1 IP反応あたり約4百万個の細胞が使用されています。このプロトコルは、総容量350μlのChIP反応において、250μlの断片化クロマチンの使用のために最適化されています。最適な結果を得るためには、これらのボリュームを一定に保つことが重要です。

記載されたプロトコルでは、細胞培養プレートにて直接固定を使用していることに注意してください。この場合、固定された細胞とスクレイプされた細胞は正確にはカウントできません。これは、接着細胞の場合、ディッシュあたりの細胞数の概算を使用する必要があることを意味します。あるいは、計数のための追加の平行板を準備して懸濁細胞を固定前に数えることもできます。

標的の存在量、抗体の特異性、および利用可能な細胞数に依存して、IPあたりの細胞数をスケールアップまたはスケールダウンすることができます。もしくははより小さいまたはより大きなバッチの細胞数で開始することも可能です。

IPあたりの細胞量をより少なくするには、2500万個の細胞のバッチ（標準プロトコルの場合）から開始し、クロマチンのせん断ステップまでのプロトコルに従います。次に、断片化クロマチンをshearing buffer iS1bで希釈してからIP反応に添加します。最適な細胞量が含まれる希釈クロマチンの最終容量は、1IP反応あたり250μlになるようにしてください。

標準プロトコルと異なる量の細胞数で開始する場合、またはIPごとにより多くの細胞を使用する場合は、最初にIPごとに使用する細胞数とIPの総数を決定します。標準プロトコルで説明されているように細胞を固定します。細胞の回収および溶解のために、100万個の細胞当たり1mLのiL1bと0.6mlのiL2bを目安にして、iL1bおよびiL2バッファの容量をスケールアップまたはスケールダウンしてください。Shearing Buffer iS1bの量は、以下が必要であることを考慮して決定してください：

- 1IPごとに250 µl のせん断化クロマチン(最適な量の細胞が含まれる)
- 1インプットごとに2.5 µl のせん断化クロマチン
- クロマチンせん断分析のための50 µl のせん断化クロマチン
- 5% の余剰量

必要量のShearing Buffer iS1bに細胞を再懸濁し、標準プロトコルに従います。

せん断緩衝液中の細胞濃度が増加または減少すると、せん断効率に影響を及ぼします。そのため、せん断条件のさらなる最適化が必要とされる可能性があります。

2. 組織量

このプロトコルは、約200mgの組織からの6つのIP反応、1つのインプットサンプルおよび1つのクロマチンせん断評価のための試料に十分なクロマチンのバッチの調製を記載しています。IP反応あたり約30mgの組織がこの標準プロトコルで使用されます。このプロトコルは、総容量350µlのChIP反応において、250µlの断片化クロマチンを使うように最適化されています。最良の結果を得るためには、これらのボリュームを一定に保つことが重要です。

標的の存在量、抗体の特異性、および利用可能な組織量に依存して、IPあたりの組織量をスケールアップまたはスケールダウンすることができます。もしくはより小さいまたはより大きなバッチの細胞数で開始することも可能です。

IPあたりの組織量をより少なくするには、標準プロトコルで推奨された200mgの組織量で開始し、クロマチン断片化ステップまで行うことができます。次に、IP反応に進む前に、Shearing Buffer iS1bでせん断されたクロマチンを希釈します。最適な組織量が含まれる希釈クロマチンの最終容量は、1IP反応あたり250µlでなければならないことに留意してください。

標準プロトコルと異なる量の組織量で開始する場合、またはIPごとにより多くの組織を使用する場合は、最初にIPごとに使用する組織量とIPの総数を決定します。

標準プロトコルに記載されているように組織を固定します。組織の固定、採取および溶解は標準プロトコルに従ってください。使用する組織量に関わらず、溶解バッファ*iL1b*および*iL2*は標準プロトコルと同量を使ってください。*Shearing Buffer iS1b*の量は、以下が必要であることを考慮して決定してください：

- 1IPごとに250 μ l の断片化クロマチン(最適な量の細胞が含まれる)
- 1インプットごとに2.5 μ l のせん断化クロマチン
- クロマチン断片化分析のための50 μ l の断片化クロマチン
- 5% の余剰量*iS1b*

必要量の*Shearing Buffer iS1b*に組織を再懸濁し、標準プロトコルに従います。

せん断緩衝液中の組織濃度が増加または減少すると、断片化効率に影響を及ぼします。そのため、断片化条件のさらなる最適化が必要とされる可能性があります。

組織サンプルから架橋クロマチンを採取する場合、クロマチンの収量は組織タイプによって大きく異なる可能性があります。一般的にクロマチン量は1IPあたり3～10 μ gが必要です。パイロット実験を行い、組織の最適量を決定することを推奨します。一度量を決定したら、その量を実験の間で一定に保ってください。

3. 固定最適化

ホルムアルデヒドは、直接相互作用する2分子を固定する際、最も一般的に使用される理想的な架橋試薬です。固定時間はターゲットに依存するため、追加の最適化が必要な場合があります。一般的に、標準的な固定プロトコルを使用した場合、転写因子（10～20分）よりもヒストンマーク（8～10分）の方が固定時間は短くなります。固定時間が長くなると、超音波処理をしてもクロマチンがせん断されにくくなるため、注意してください。

しかしながら、より高次の相互作用、または動的な相互作用については、効率的なタンパク質 - タンパク質固定化のために他の架橋剤を考慮する必要があります。その場合、革新的なデュアルクロスリンク ChIP 固定試薬である、Diagenode ChIP Cross-link Gold（Diagenode、カタログ番号C01019027）をおすすめします。

4. 断片化最適化

クロマチン断片化は、ChIP手順における最も重要なステップの1つです。ChIP実験に理想的なのは 100～600bpの間のクロマチン断片です。最適な超音波処理時間は、細胞型、細胞密度、試料量、固定時間などの多くの要因に依存します。したがって、新しいChIPプロジェクトごとに超音波処理条件を最適化することが重要です。

本キットは、クロマチン断片化最適化のための十分な試薬を含有しておりません。本キットを用いた実験を行う前に断片化条件の最適化を行うには、iDeal ChIP-qPCRキットに適合するクロマチン調製に必要なすべてのバッファを含むLow SDS (iDeal Kit for TFs) (カタログ番号 C01020013) を使用することをお勧めします。このキットに含まれる試薬を使うことで、最適化された断片化条件でクロマチンを調製することができます。

Picoruptorを使用する場合は、5-10-15回の音波処理サイクルの最初のタイムコース実験を30 "ON / 30" OFFにすることをお勧めします。詳しくはPicoruptor

(<https://www.diagenode.com/files/protocols/bioruptor-pico-chromatin-preparation-guide.pdf>) のクロマチン調製についてのガイドを参照してください。

なるべく短い時間で、効率的にクロマチンを断片化するように超音波処理を行ってください。過剰な超音波処理はChIPの効率を低下させる可能性があります。

5. 磁気ビーズ

このキットには、DiaMag Protein Aでコーティングされた磁気ビーズが含まれています。乾燥すると性能が低下するため、実験中にビーズが乾かないようにしてください。ピペッティングするときはいつも懸濁液中でビーズ量が均一になるように注意してください。ビーズの量の変動は再現性を低下させます。また、ビーズを凍らせないでください。

DiaMag Protein A-coated magnetic beads は、ウサギ、モルモット、イヌおよびブタポリクローナルおよびモノクローナルAb、マウスIgG2a、IgG2bおよびIgAおよびヒトIgG1、IgG2およびIgG4の免疫沈降に適しています。

ChIPで使用する抗体の品質は、実験の成功に大きく影響します。検証済み抗体のみを使用することをお勧めします。具体的には標的を認識させることが推奨されます。当社では、ChIP / ChIP-seqで特異性が確認されている、広範に検証された高性能抗体を提供しています。各バッチは検証され、バッチ固有のデータはウェブサイト www.diagenode.com で入手できます

6. インプット

インプットサンプルは、免疫選択なしで完全なChIP手順を経た完全なゲノムDNAに対応します。インプットサンプルは、ChIP手順の終了時に回収を計算するための基準として使用されます。ChIP実験ごとに1つの入力を含めることをお勧めします。このキットは、目的の抗体と共に使用されるものと同じクロマチン上のIPの効率をモニターするために、ネガティブコントロール (IgG) およびポジティブコントロール (CTCF) 抗体を含みます。ChIP反応の各シリーズに1つのネガティブコントロールIgGを含めることを推奨します。また、ポジティブコントロールChIP-seq grade CTCF抗体を少なくとも1回使用することを推奨します。このキットはまた、ヒト (H19インプリンティングコントロール領域およびミオグロビンエクソン2) におけるCTCFのポジティブおよびネガティブコントロール標的を増幅するためのqPCRプライマー対を含みます。

7. ネガティブコントロールとポジティブコントロール

このキットにはネガティブIgG抗体とポジティブコントロールCTCF抗体が含まれています。ChIP反応の各シリーズに1つのネガティブIgGコントロールを含めることを推奨します。

8. 定量化

ChIPの後、ThermoFisher ScientificのQubit®システムでdsDNA HS Assay Kitなどの高感度な方法でIP化したDNAの濃度を測定します。PicoGreen®も適していますが、NanoDropのようなUV分光光度法は、一般的に感度が充分ではありません。ほとんどの場合、IP化された物質の約10%を定量に使用すれば十分です。DNA収量は、細胞型、使用される抗体の品質および抗体標的などの異なる因子に

依存します。 400万個のHeLa細胞に対する陽性対照CTCF抗体で得られる予想されるDNA収率は、約20ngです。

9. 定量PCR分析

当社では少なくとも 1 つの陽性対照領域および 1 つの陰性対照領域を用いて SYBR®Green qPCR によりインプットおよび免疫沈降したサンプルを分析して濃縮度を決定することを推奨しています。このキットは、キット (CTCF ChIP-seq グレード抗体) で提供されたコントロール抗体のポジティブ (H19 インプリンティングコントロール領域) およびネガティブ (ミオグロビンエクソン 2) の 2 つの領域を標的とする 2 つのプライマー対を含みます。各特異的抗体は、ユーザーによって設計された特異的制御プライマーを必要とします。各プライマー対について、免疫沈降した試料の横にインプット DNA を流します。異常値を同定するために 3 回実施することが推奨されますが、少なくとも 2 回は PCR 反応を行うことをおすすめします。

PROTOCOL

CELLS	STEP 1 – 細胞収集およびDNA-タンパク質架橋反応（培養細胞）	17
	STEP 2 – 細胞溶解およびクロマチン断片化（培養細胞）	18
TISSUES	STEP 1 – 組織解離およびDNA—タンパク質架橋反応（組織）	21
	STEP 2 - 細胞溶解およびクロマチン断片化（組織）	23
CELLS & TISSUES	STEP 3 - 磁気免疫沈降	26
	STEP 4 – DNA精製および脱架橋	28
	STEP 5 - 定量PCR解析	31

プロトコル

本キットは、細胞や組織からのクロマチン調製と免疫沈降に適しています。ステップ1「DNA-タンパク質架橋」およびステップ2「細胞溶解およびクロマチン断片化」のプロトコルは、細胞および組織で異なります。それぞれ対応するセクションを参照してください。ステップ3「磁気免疫沈降」以降は、両方のサンプルタイプについて同じプロトコルです。

以下のプロトコルは、約2500万個の細胞または組織200mgのバッチからのクロマチン調製物（ホルムアルデヒド架橋、細胞収集、溶解およびクロマチン断片化）を記載しています。これは、6つのChIP反応（IPあたり約4百万個の細胞または30mgの組織を使用する）、1つのインプットおよび1つのクロマチンせん断評価用サンプルに十分な量です。

記載されたプロトコルは、細胞培養プレートにおいて迅速な直接固定を使用することに注意してください。固定細胞とスクレイプされた細胞は正確にはカウントできません。これは、接着細胞の場合、プレートあたりの細胞数を概算する必要があることを意味します。あるいは、計数のための追加の平行板を準備すると、固定前に懸濁細胞を数えることができます。

IPごとに異なる量のスタート材料、または異なる量の材料を使用する場合は、「始める前の注意点」を参照してください。



STEP 1

細胞採取およびDNA-タンパク質架橋反応



Day 1



30 minutes

培養細胞を使用する場合

- 1.1. 使用前にFixation Bufferを室温に戻します。
- 1.2. Cross-Linking Solutionを調製します。ヒュームフード内で、ホルムアルデヒドが最終濃度11%になるように、**Fixation Buffer**に添加します。例えば、37%ホルムアルデヒド0.596mlを**Fixation Buffer**1.407mlに加えます。次にCross-Linking Solutionを1:10の割合で細胞培養培地に直接加える。例えば20 mlの細胞培養には、2 mlのCross-Linking Solutionを添加します。

- 1.3. 穏やかに振とうしながら室温で15分間細胞をインキュベートします。

NOTE: 固定時間は、さらに最適化が必要な場合があります。「始める前の注意点」を参照してください。

- 1.4. 1:10の割合で**Glycine**を細胞培養培地に添加して固定を停止します（例えば、20mlの細胞培養液で開始したときに2.2mlのグリシンを加える）。穏やかに振とうしながら室温で5分間インキュベートします。その後すぐに次のステップに進んでください。

NOTE: ChIPの前に行う断片化クロマチンの調製には、新しく固定した細胞を使用することを強くお勧めします。それが難しい場合、固定細胞は-80℃で最大4ヶ月間保存することができます。細胞を凍結するために、培地を除去し、20mlのPBSで細胞を1回洗浄します。次に別の5mlのPBSを添加し、スクレイピングまたは500xgで5分間、4℃で遠心分離し上清を捨て細胞を回収し、細胞ペレットを-80℃で保存します



STEP 2

細胞溶解 およびクロマチン断片化



Day 1



1 to 2 hours

培養細胞を使用する場合

接着細胞の場合:

- 2.1. 培地を除去し、**20mlのPBS**で細胞を1回洗浄して、PBSを捨てます。
4°Cまたは氷上ですべてを保管してください。
- 2.2. **5mlの氷冷 Lysis buffer iL1b**をプレートに加えます。細胞をスクレイピングして収集し、50mlチューブに移す。
- 2.3. フラスコを**20mlのLysis buffer L1b**ですすぎ、これを50mlチューブに加えます。Lysis buffer iL1bの全容量は、**25万個の細胞あたり25ml**になるようにしてください。スケールアップまたはダウンする場合、細胞1万個あたり1mlのiL1bを用いるようにしてください。その後ステップ2.4に直ちに進んでください。

浮遊細胞の場合:

- 2.1. 細胞を50mlチューブに移します。500×gおよび4°Cで**5 分間**遠心分離して細胞をペレット化し、上清の細胞培養培地を捨てます。
- 2.2. 氷冷**PBS 20 ml**に細胞を再懸濁し、500 x gおよび4°Cで**5 分間**遠心分離し、上清を静かに捨てます。4°Cまたは氷上ですべてを保管してください。



- 2.3. 氷冷lysis buffer iL1b 1mlに細胞を数回上下にピペットで再懸濁します。24mlのiL1bを添加し、2500万の細胞に対し総容量が25mlになるようにします。スケールアップまたはダウンする場合は、100万細胞あたりiL1bを1ml使用してください。その後ステップ2.4に直ちに進んでください。
- 2.4. DiaMag Rotatorで穏やかに混合しながら4°Cで20分間インキュベートします。500×gおよび4°Cで5分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を捨てます。1mlの氷冷Lysis Buffer iL2に細胞ペレットを再懸濁し、数回ピペッティングしてください。14 mlのiL2を添加し、DiaMag Rotator上で穏やかに混合しながら4°Cで10分間インキュベートします。スケールアップまたはダウンする場合は、100万個の細胞あたり600μlのバッファーiL2を使用してください。
- 2.5. 細胞を500×gおよび4°Cで5分間遠心分離して再度ペレット化し、上清を捨てます。
- 2.6. 1.67mlのShearing Buffer iS1bに8.4μlの200xprotease inhibitor cocktailを加えます。これは、2500万個の細胞に必要なShearing Bufferの総量です。氷上においてください。
- 2.7. 調製したShearing Buffer iS1bを細胞ペレットに加えます。せん断緩衝液中の細胞濃度は、100μlのiS1b当たり150万個の細胞になるようにしてください。ピペットで上下に数回細胞を再懸濁し、氷上で10分間インキュベートします。次に細胞懸濁液を最大300μlずつ、適切な超音波マイクロチューブに分注してください：
 - Picoruptorを使用する場合は、1.5 mlのPicoruptor with Caps (カタログ番号 C30010016) を使用してください。
- NOTE: Picoruptorによる断片化の最大容量は、1.5mlのマイクロチューブあたり300μlです。超音波処理の効率を上げるために、必ず正しいタイプのマイクロチューブを使用してください。
- 2.8. 超音波処理でクロマチンを切断します。
 - Picoruptorを使用する場合、30秒間 "ON"、30秒間 "OFF"で5～12回のせん断を行ってください。

NOTE: Chromatin Shearing Optimization kit - LowSDS (iDeal Kit for TFs) (カタログ番号C01020013) を使用して、新しいサンプルタイプごとにパイロット実験を行うことをお勧めします。

- 2.9. サンプル中の液体を15秒間短くスピンドウンします。サンプルを新しい1.5 mlチューブに移し、16,000 x g、4°Cで10分間遠心します。断片化クロマチンを含む上清をプールします。
- 2.10. 別のセクション「クロマチン断片化分析のプロトコル」に記載されているように、断片化アセスメントのために断片化クロマチン50µlのアリコートを取り分けておきます。

NOTE: クロマチンの各バッチの断片化解析をお勧めします。所定の実験条件（細胞型、細胞数および固定）に対する最適な超音波処理の設定が以前に最適化されている場合、このステップを省略することができます。クロマチン断片化の分析は、以下に続くプロトコルのステップと並行して行うことができます。もしくはStep 4.2（脱架橋）から始まるメインのワークフローに含めることもできます。分析に使用するときまで、-20 °Cでクロマチンアリコートを保存します。

- 2.11. 免疫沈降（Step3 磁気免疫沈降）に進みます。すぐに使用しない場合、クロマチンは-80°Cで最大二ヶ月間保存することができます。



STEP 1

組織解離および DNA-タンパク質架橋反応



Day 1



30 minutes

組織を使用する場合

- 1.1. 使用前にFixation Bufferを室温に戻します。
- 1.2. ヒュームフード内で、**37%ホルムアルデヒド54 μ l**を、最終濃度1%になるように、**2mlのFixation Buffer**に添加し、Cross-Linking Solutionを調製します。1つのクロマチン調製に2 mlのFixation Bufferを使用します。
- 1.3. 氷上でペトリ皿に新鮮または凍結組織（200mgまで）を必要量入れます。サンプルは常に氷上に置き、サンプルの劣化を防ぐために操作時間を最小限に抑えてください。
- 1.4. メスの刃を使用して組織を小さな断片（1～3 mm³）に切り、ダウンス型ホモジナイザーに移します。**Fixation Buffer**で希釈したホルムアルデヒド**1 ml**を加えます。
- 1.5. 均一な懸濁液を得るために、ダウンス型ホモジナイザーを用いて組織を直ちにホモジナイズします。総固定時間**15分間**のタイマーを設定します。この時点から固定時間の計測を開始します。

1.6. 組織懸濁液を15mlチューブに移します。ダウンス型ホモジナイザーに希釈したホルムアルデヒド**1ml**を追加して洗い流し、同じ15 mlチューブにサンプルをプールします。

1.7. 室温で、DiaMag Rotatorで穏やかに回転させながら、Step 1.5から開始した固定時間が合計で15分間になるまでインキュベートします。

NOTE: 固定時間は、さらに最適化が必要な場合があります。「始める前の注意点」を参照してください。

1.8. 組織懸濁液に**200μlのGlycine**を加えて固定を停止します。DiaMag Rotatorで穏やかに混合しながら室温で5分間インキュベートします。すぐに次のステップに進んでください。

NOTE: 断片化クロマチンの調製には、新しく固定した組織を使用することを強くお勧めします。それが難しい場合、固定組織は-80℃で最大4ヶ月間保存することができます。組織を凍結するには、培地を除去し、2mlのPBSで組織を1回洗浄し、組織ペレットを-80℃で保存します



STEP 2

細胞溶解および クロマチン断片化



Day 1



1 to 2 hours

組織を使用する場合

NOTE: 本キットとは別に、1つのクロマチン調製物につき100μlのプロテアーゼ阻害剤カクテルが必要です

- 2.1. サンプルを4°Cで5分間、850 x gで遠心分離します。静かに上清を捨てペレットを残しておきます。
- 2.2. ペレットを10 mlの氷冷PBSで洗浄し、850 x gで4°Cで5分間遠心し、静かに上清を捨てます。4°Cまたは氷上ですべてを保管してください。
- 2.3. **200x Protease inhibitor cocktail** 50μlを10mlの氷冷**Lysis Buffer iL1b**に添加します。
- 2.4. 氷冷した**Lysis Buffer iL1b** 1mlをペレットに添加し、数回ピペットで再懸濁します。その後残りの9mLの**iL1b**を追加します。
- 2.5. DiaMag Rotatorで穏やかに混合しながら4°Cで20分間インキュベートします。
- 2.6. 4°Cで850 x gで5分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を捨てます。

- 2.7. **200x Protease inhibitor cocktail 50 μ l**を**10ml**の氷冷**Lysis Buffer iL2**に添加します。氷冷した**Lysis buffer iL2** 1mlを細胞ペレットに添加し、数回ピペッティングすることにより細胞を再懸濁します。その後残りの**9mL**の**iL2**を追加します。
 - 2.8. DiaMag Rotatorで**10分間**穏やかに混合しながら**4°C**でインキュベートします。
 - 2.9. **4°C**で**850 x g**で**5分間**遠心分離して細胞を再びペレット化し、上清を捨てます
 - 2.10. **1.67ml**の**Shearing Buffer iS1b**に**8.4 μ l**の**200xProtease inhibitor cocktail**を加えます。氷上で操作してください。
 - 2.11. ペレットに準備したShearing Buffer iS1bを添加します。ピペットで上下に数回細胞を再懸濁し、バウンスホモジナイザー（タイトなペッスル）を用いてホモジナイズします。氷上で**10分間**インキュベートしてください。
 - 2.12. 細胞懸濁液を最大**300 μ l**ずつ、適切な**1.5ml**超音波破碎用マイクロチューブに分注します。
 - Picoruptorを使用する場合は、**1.5 ml**の**Picoruptor Microtubes with Caps**（カタログ番号 **C30010016**）を使用してください。
- NOTE: Picoruptorによる断片化の最大容量は、**1.5ml**のマイクロチューブあたり**300 μ l**です。超音波処理の効率を上げるために、必ず正しいタイプのマイクロチューブを使用してください。
- 2.13. Picoruptorを用いた超音波処理でクロマチンを切断します。
 - Picoruptorを使用する場合、**30秒間 "ON"**、**30秒間 "OFF"**で**5～12回**の断片化を行ってください。

NOTE: Chromatin Shearing Optimization kit - Low SDS (iDeal Kit for TFs) (カタログ番号**C01020013**)を使用して、新しいサンプルタイプごとにパイロット実験を行うことをお勧めします。

- 2.14. サンプル中の液体を15秒間短くスピンドウンします。サンプルを新しい1.5 mlチューブに移し、16,000 x gで4°C、10分間遠心します。断片化クロマチンを含む上清をプールします。
- 2.15. 断片化評価のために、断片化クロマチン50μLを取り分けておきます。クロマチン断片化分析のプロトコルは、別セクション「クロマチン断片化分析のプロトコル」を参照してください。

NOTE: クロマチンの各バッチの断片化解析をお勧めします。所定の実験条件（細胞型、細胞数および固定）に対する最適な超音波処理の設定が以前に行われている場合、このステップを省略することができます。クロマチン断片化の分析は、以下に続くプロトコルのステップと並行して行うことができます。もしくはStep 4.2（脱架橋）から始まるメインのワークフローに含めることもできます。分析に使用する時まで、-20°Cでクロマチンアリコートを保存します。

- 2.16. 免疫沈降（Step 3 磁気免疫沈降）に進みます。すぐに使用しない場合、クロマチンは-80°Cで最大2ヶ月間保存することができます。



STEP 3

磁気免疫沈降



Day 1-2



Overnight

培養細胞および組織（共通）

- 3.1. ネガティブコントロールIP (IgG) を含む、IP反応の総数を決定します。1IPあたり **30μl**の**DiaMag Protein A-coated magnetic beads**を取り、新しい1.5 mlチューブに移します。
- 3.2. 以下の試薬を混合して**1x ChIP Buffer iC1b 4 ml**を調製します:
 - 3.2 ml ChIP-seq grade water
 - 0.8 ml 5x ChIP buffer iC1b
 - 80 μl of 5% BSA希釈した1x ChIP Buffer iC1b は氷上に置いてください。
- 3.3. **1ml**の氷冷**1xChIP Buffer iC1b**でビーズを3回洗浄します。ビーズを洗浄するには、ビーズ懸濁液に直接1x ChIP Buffer iC1b 1 mlを加え、ピペットで数回上下させてビーズを再懸濁し、**4°C**で**5分間**振とうしながらインキュベートします。チューブをスピンドウンさせ、1.5 ml Diagenode磁気ラック（DiaMag1.5）にセットします。1分間待ってビーズを磁石に捕捉させ上清を除去します。これを2回繰り返します。
- 3.4. 最後の洗浄後、ビーズの元の容量（IPあたり30μl）を加えて**1x ChIP Buffer iC1b**にビーズを再懸濁します。
- 3.5. 必要な数の1.5mlチューブ（1 IPあたり1本）に、**30μl**の洗浄したビーズを各チューブに加えます。

- 3.6. 以下に1IP分の**ChIP reaction mix**の調製法を記載します。[必要なIP数+0.5]回のようにIP数を設定し、スケールアップしてください。

NOTE: 異なる抗体または異なる量の抗体を使用する場合は、それぞれ別々のChIP reaction mixを準備してください。

- 6 µl of BSA
- 1.8 µl 200x protease inhibitor cocktail
- 20 µl 5x iC1b buffer
- (42.2 µl – x µl) ChIP-seq grade water
- x µl のChIP-seq grade antibodyを加える

x - ChIP-seq grade antibody の量

1IPにおけるChIP反応の総量は70µLとなります

NOTE: IPあたりの抗体の必要量は変わることがあります。サプライヤーの推奨をチェックするか、抗体の量を変えて滴定曲線を作成してください。ネガティブコントロールIPには1µgのIgG（ネガティブコントロール抗体）を使用します。必要に応じて、NaBu（最終濃度20mM）または他のHDAC阻害剤を添加することもできます

- 3.7. **70µlのChIP reaction mix**を**30µl**の洗浄した**Protein A-coated magnetic beads**を含有するそれぞれのチューブに加えます。チューブを**4°C**で**2～4時間**インキュベートし、DiaMag Rotatorで一定回転下でインキュベートします。

- 3.8. ChIP reaction mixを入れたチューブを軽くスピンドウンし、断片化クロマチン**250µl**を加えます。チューブを**4°C**で一晩DiaMag Rotatorで回転させ、インキュベートします。また、Step 4.3から始まるインプットサンプルとして使用するために、断片化クロマチン**2.5µl**を取り分け**4°C**で保存してください。

- 3.9. 以下のように洗浄を行います：チューブを短くスピンドウンさせてDiaMag1.5にセットします。1分間待って上清を除去します。**Wash Buffer iW1 350µl**を加えます：ビーズを再懸濁するためにチューブを静かに振とうし、**4°C**でDiaMag Rotatorで**5分間**インキュベートします。

- 3.10. **Wash Buffer iW2、iW3およびiW4**をそれぞれ用いて、上記の洗浄工程を1回ずつ繰り返します。



STEP 4

溶出、DNA精製および脱架橋



Day2



5 hours

培養細胞および組織（共通）

NOTE: キットの最初の使用の前に、等容量のイソプロパノールを加えてWash buffer 1 と洗Wash buffer 2を調製します。洗浄バッファ-1と2は4℃で保存してください。蒸発を避けるために、保管中はボトルを開けたままにしないでください。

- 4.1. 最後の洗浄バッファ-を除去した後、**100μlのElution buffer iE1**をビーズに加え、ビーズペレットを再懸濁し、室温でDiaMag Rotatorで**30分間**インキュベートします。

NOTE: Elution buffer iE1 に沈殿物が観察された場合、それが透明になるまで37℃で加温してください。この過程は反応には影響しません。

- 4.2. チューブを軽くスピンドウンさせ、DiaMag1.5磁気ラックに入れます。1分間待って上清を新しい1.5 mlチューブに移し、**4μlのElution Buffer iE2**を加えます。同時に、**97.5μlのbuffer iE1**および**4μlのbuffer iE2**を**2.5μlのINPUT**試料に加えます。振盪しながら65℃で**4時間**又は**一晩**インキュベートします。

NOTE: この段階で、断片化評価のためのクロマチンサンプル（細胞についてはStep 2.10、組織についてはStep 2.15からの続き）を含めることができます。IPおよびインプットサンプルと並行して、脱架橋およびDNA精製を行います。別セクション「クロマチンせん断分析のプロトコル」に記載されている指示に従ってください。

- 4.3. 各IPおよびINPUTサンプルに**2μl**の**Carrier**を加えます。
- 4.4. 各IPおよびINPUTサンプルに**100μl**の**100%**イソプロパノールを加えます。

NOTE: イソプロパノールの添加後、溶液は濁ることがありますが、これは実験に有害ではなく、精製されたDNAの品質や量に影響を与えません。

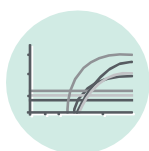
- 4.5. ボルテックスで**IPurebeads v2**を再懸濁し、**10μl**を各IPおよびINPUTサンプルに移します。
- 4.6. DiaMag RotatorでIPおよびINPUTサンプルを室温で**10分間**インキュベートします。
- 4.7. チューブを軽くスピンドウンさせ、DiaMag1.5磁気ラックにセットし、**1分**待ってバッファーを捨てます。
- 4.8. チューブあたり**100μl**の**Wash Buffer 1**を加えます。ビーズペレットが完全に再懸濁するまで、チューブを閉じてよくボルテックスします。室温で30秒間インキュベートした後、チューブを軽くスピンドウンさせ、DiaMag1.5磁気ラックにセットし、**1分**待ってバッファーを捨てます。
- 4.9. チューブあたり**100μl**の**Wash Buffer 2**を加えます。ビーズペレットが完全に再懸濁するまで、チューブを閉じてよくボルテックスします。室温で30秒間インキュベートした後、チューブを軽くスピンドウンさせてDiaMag 1.5磁気ラックに入れ、**1分**待ってバッファーを捨てます。
- 4.10. チューブを再びスピンドウンさせ、DiaMag1.5に置きます。必要に応じて残りの洗浄バッファー2を捨てます。**25μl**の**Buffer C**にビーズペレットを再懸濁し、DiaMag Rotatorで**15分間**室温でインキュベートします。

NOTE: Buffer Cは、qPCR解析や次世代シーケンシングのためのライブラリー作成などのダウンストリームアプリケーションと互換性があります。

- 4.11. チューブを回転させてDiaMag1.5にセットし、1分間待って免疫沈降したDNAを含む上清を新しい.5 mlチューブに移します。ビーズは捨ててください。
- 4.12. DNAを氷上に置き、2 μ lのIP化DNAをQubit®dsDNA HS Assay Kitまたはそれに準ずる方法で濃度を測定します。
- 4.13. 各サンプルについてqPCRによって分析される領域の総数を決定します。必要な量のINPUTと免疫沈降したサンプルをqPCR解析に使用します。これらのサンプルは1/10に希釈され、PCR反応につき5 μ lが使用されることを考慮に入れてください。

NOTE: サンプルの希釈率およびPCR当たりの容量は、使用されるマスターミックスおよびqPCRサイクラーの感度に依存して変化する場合があります。

- 4.14. その後の使用まで-20°Cで残りのDNAを保存します。



STEP 5

定量PCR解析



Day 2



2 to 3 hours

培養細胞および組織（共通）

NOTE: 各プライマー対について、免疫沈降した試料およびネガティブIgGコントロールと一緒にINPUT DNAを流してください。

- 5.1. 免疫沈降したDNAと対応するインプットサンプルを取り分けます（Step 4.13参照）ChIP-seq grade waterを用いてそれらを1/10に希釈します。
- 5.2. 次のように**qPCR mix**を調製します。ユーザーが用意するプライマー対を使用して20μlの反応量となります：
 - 10 μl of a 2x SYBR[®] Green qPCR master mix
 - 1 μl of primer pair
 - 4 μl of water
 - 5 μl of diluted IP'd or INPUT DNA

- 5.3. 次のようにPCRプログラムを設定します：

NOTE: これらの条件は、マスターミックスの種類、使用するqPCRシステムおよびユーザーが準備するプライマー対の種類に応じて最適化が必要な場合があります。

ステップ	時間/サイクル数		温度
1. 熱変性	3-10 分*		95℃
2. 増幅	30 秒	40 サイクル	95℃
	30 秒		60℃
	30 秒		72℃ (蛍光データを取得する)
3.融解曲線**	qPCR機器メーカーの推奨事項に従う		

* Taq ポリメラーゼ活性化時間に関するサプライヤーの推奨事項を注意深く確認してください

** プライマー対が単一の特定の産物のみを増幅することを確実にするために、qPCR機器メーカーが推奨するプロトコルに基づいて融解曲線を含め検査してください。

5.4. IP DNAサンプルおよびインプット、それぞれのプライマーについて、qPCRの指数関数的増幅域から閾値サイクル (Ct値) を記録します。

5.5. 以下の式を使用して、対照領域のINPUT DNAと比較した免疫沈降したDNAの相対量 (回収率) を計算します:

$$\% \text{ recovery} = 2^{((Ct_{\text{input}} - 6.64) - Ct_{\text{sample}})} * 100\%$$

- Ct_{sample} と Ct_{input} は、それぞれIPサンプルのDNAサンプルとINPUTのqPCRの指数関数的増幅域から得られる閾値サイクルです。
- 2 は増幅効率です。
- 6.64 は入力希釈を補正するための補正係数です

NOTE: この方程式は、PCRが100 %効率的であると仮定しています (増幅効率= 2)。正確な結果を得るには、所定のプライマー対を用いた増幅効率は100 %に近くなければならず、各サイクルにおいて生成物の量は2倍 ($E=2$) であることを意味しています。実際の増幅効率が既知の場合は、その数値を使用する必要があります。この式では、INPUTの1 %がプロトコルで示唆されているように使用されていることが考慮されています (2.5 μl INPUTとIPあたり250 μl のクロマチン)。使用されるINPUTの量が1 %と異なる場合、以下のように入力希釈 (x) を補正するために、式に補正係数を導入する必要があります:

$$\% \text{ recovery} = 2^{[(Ct(\text{input}) - \log_2(X\%) - Ct)]} \times 100\% \text{ Where:}$$

$\log_2(x)$ accounts for the INPUT dilution

Example: 1IPあたり250 μl のクロマチンから5 μL のINPUTを使用する場合は、50倍希釈に相当します。補正係数は $\log_2(50) = 5.64$ に等しく、回収を計算する四季は次のようになります。 $\therefore \% \text{ recovery} = 2^{[(Ct(\text{input}) - 5.64 - Ct(\text{sample}))]} \times 100\%$

5.6. バックグラウンドが低く、ポジティブな遺伝子座に対する予想される濃縮が観察された場合は、適切なプロトコル (iDeal TFキットに付属していない) を用いてライブラリー調製に進んでください。

ライブラリー調製とシーケンシングのすすめ

TFプロトコル用のiDeal ChIP-seqは、Illumina®HiSeqNext-GenシーケンサーでChIP-seqで検証されています。ですが、Illumina（登録商標）Miseq（登録商標）またはLife Technologies SOLiD（登録商標）システムなどの他のシーケンシングシステムも使用することができます。

Illumina®シーケンサーと互換性のあるライブラリー作製のために、当社の以下のキットの使用を強くおすすめします：

- MicroPlex Library Preparation Kit v2（カタログ番号C05010012、12個のインデックス、C05010014、48個のインデックス）
- iDeal Library Preparation Kit x24（インデックスプライマーセット1を含む）（カタログ番号C05010020）



**ASK THE
EXPERTS**

ChIP-seq実験やバイオインフォマティクスデータ分析の設計に関するご質問がある場合は、弊社のカスタマーサポートチームまでお気軽にお問い合わせください。

Contact for Europe, Asia, Oceania and Africa:

custsupport@diagenode.com

Contact for North and South America:

custsupport.na@diagenode.com

ChIP-seqデータ分析推奨ソフトウェア

ChIP-seq データ分析ワークフロー

次の章では、ChIP-seqデータ分析の基本について説明します。また、各ステップに適したソフトウェアツールの例をいくつか紹介します。フリーソフトウェアや商用ソフトウェアを含む多くの分析ツールを挙げています。

1. (オプションのステップ) トリミング：トリミングを使用して、アダプターの汚染などリードセット内の品質の低いベースやアーチファクトを取り除きます
 - a. Cutadapt
 - b. Trim Galore!
 - c. Trimmomatic
2. アラインメント:リファレンス配列に対してリードをマップして比較します。
 - a. ELAND
 - b. Tmap
 - c. BWA
 - d. Bowtie2
3. (オプションのステップ) 品質管理：シーケンシングとアラインメントの一般的な品質を確認できます
 - a. FastQC
 - b. Picard Tools
4. ピークコール：ピークコール時に、ソフトウェアはゲノムに沿った濃縮サイトを検出します
 - a. MACS2
 - b. SICER
 - c. ZINBA
 - d. PeakRanger



- e. Pyicoteo
- f. MUSIC
- g. SPP
- h. hiddenDomains

上記の基本分析の後、ピークをさらに分析して生物学的な質問に答えることができます。さらなる分析のための無数の方法とツールがありますが、プロジェクトの目標によってどのプロジェクトを選ぶべきかが決まります。基本的な分析の場合と同様に、目的と機能を理解するために、選択したソフトウェアツールのマニュアルをよく調べることをお勧めします。以下では、ピークをさらに処理するためのいくつかの一般的な解析タイプと、サンプルツールを再度示します。

5. 視覚化：ピーク、読み取り、および他のデータ（例えば、遺伝子位置）を適切なゲノムブラウザに表示することができます。
 - a. IGV
 - b. IGB
 - c. UCSC Genome Browser
6. 記述的統計：ピークは、いくつかの読み込みに該当するか、それらの数はいくつか、平均サイズおよび重要度など、様々な有用な方法で記述することができます。これらの数字は、データセットを比較するときにも非常に役立ちます

実験結果の例

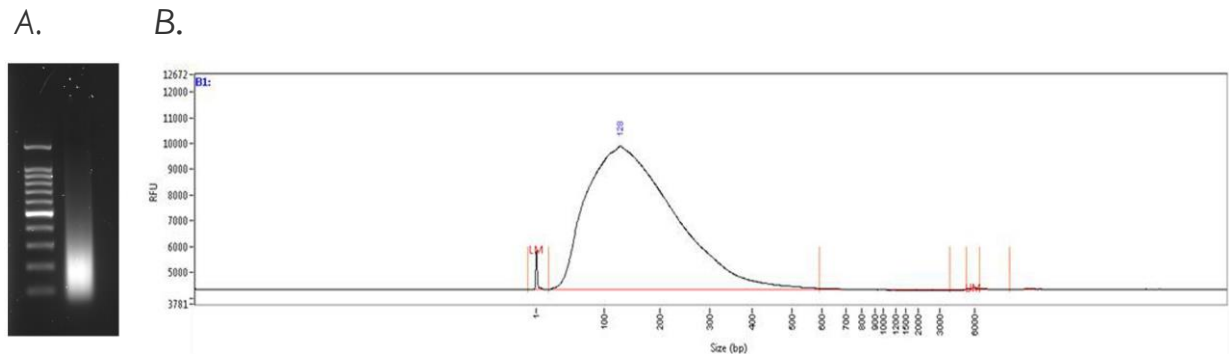


Figure 2. PicoruptorとTFのiDeal-ChIP-seqを使用して成功したクロマチン断片化

HeLa細胞をホルムアルデヒドで固定し、TFプロトコルのためにiDeal-ChIP-seqに応じてクロマチンを調製した。 Picoruptorを使用して、30サイクルON / 30秒OFFの8サイクルにわたってサンプルを超音波処理した。100bpのはしごをサイズ標準として装填した。パネルA：アガロースゲル電気泳動による断片サイズ評価。 パネルB：フラグメント分析装置（Advanced Analytical）を用いたフラグメントサイズ評価。

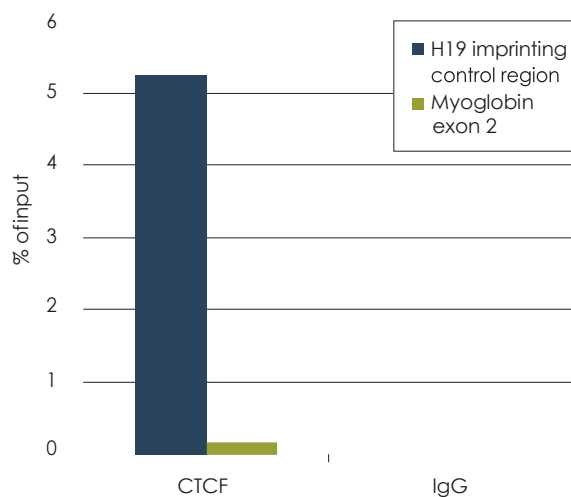


Figure 3. anti-CTCF抗体を用いたクロマチン免疫沈降解析

本キットからのコントロール抗体を用いてヒトHeLa細胞上でChIPを実施した。400万細胞からの断片化したクロマチン、1μgのポジティブコントロール抗体および1μgのネガティブIgGコントロールをIPごとに使用した。

本キットからのコントロール抗体を用いてヒトHeLa細胞上でChIPを実施した。400万細胞からの断片化したクロマチン、1 μ gのポジティブコントロール抗体および1 μ gのネガティブIgGコントロールをIPごとに使用した。キットからのポジティブコントロールH19インプリンティングコントロール領域およびネガティブコントロールミオグロビンエクソン2プライマーセットを用いて定量PCRを実施した。図は、インプットの%（qPCR分析後の入力DNAと比較した免疫沈降したDNAの相対量）として表される回収を示す。

ポジティブコントロール抗体（CTCF）については、ポジティブコントロール標的（H19インプリンティングコントロール領域）の回収率は約5%であると予想されるが、これは使用する細胞タイプに依存する。陰性対照標的（Myoglobinエクソン2遺伝子座）の回収率は、Figure 3に示すように0.5%未満であるべきである。

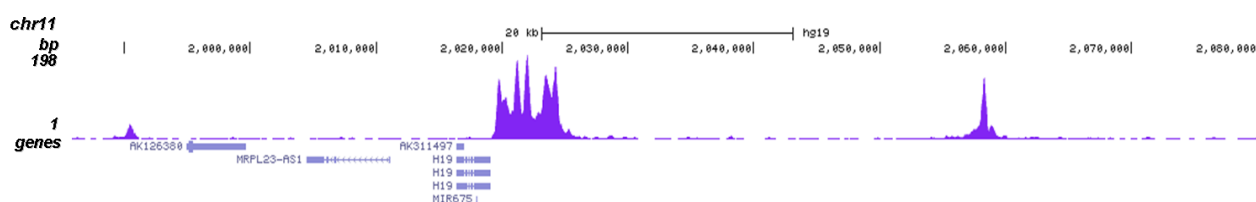


Figure 4. 当社のanti-CTCF抗体で得られたChIP-seq結果

ChIPは、転写因子用のiDeal ChIP-seq kitおよびCTCF陽性対照抗体1 μ gを使用して、4,000,000個のHeLa細胞から切断されたクロマチンに対して行った。続いてIP化したDNAをIllumina HiSeq 2000で分析した。ライブラリー調製、クラスター生成および配列決定を製造者の指示に従って行った。50bpのタグは、BWAアルゴリズムを用いてヒトゲノムに整列させた。Figure 4は、H19インプリンティング制御領域を囲むゲノム領域におけるピーク分布を示す。

クロマチン断片化分析プロトコル

総説

断片化を評価するために、アガロースゲル分析またはフラグメントアナライザー（Advanced Analytical）の使用を推奨します。

クロマチン断片の正確なサイズ決定のために、RNase処理およびその後のDNA精製を含む脱架橋が推奨されます。脱架橋をしない場合、クロマチン断片のサイズ推定は正確ではありません。架橋の存在は、電気泳動移動を遅らせるので、フラグメントサイズの誤解を招きます。RNase処理は、分解されたRNAに起因するバックグラウンドを有意に減少させ、断片化の視覚的評価を改善するでしょう。

ワークフロー:

- RNase処理（1時間、オプションですが、正確なサイズ評価に強く推奨されます）
- 脱架橋（4時間または一晩）
- IPure beads (v.2)を使用したDNA精製 (30 分)
- フラグメントサイズ分析（アガロースゲルまたはフラグメントアナライザー）（1時間）

RNase 処理

NOTE: 本キットには、RNase カクテル（Ambion、AM2286A など）は付属していません。

1. 断片化クロマチン**50μl**（細胞についてはステップ2.10、組織についてはステップ2.15を参照）を採取し、1.5mlマイクロチューブに移します。
2. **1μl**のRNaseカクテル（例えばAmbion、AM2286A）を**150μl**のChIP grade water中に希釈します。
3. 希釈したRNaseカクテル**2μl**を分注した断片化クロマチンに加えます。
4. 37°Cで**1時間**インキュベートします。



脱架橋

5. **50 µl** の **Elution buffer iE1** を加えます。
6. **4 µl** の **Elution buffer iE2** を加えよく混ぜます。
7. サンプルを 65°C で **4時間** (もしくは **一晩**) インキュベートします

DNA 精製

NOTE: 以下のプロトコルは、キットに含まれるIPure 磁気ビーズを用いたDNA精製を記載しています。DNA 精製の他の方法（カラムベースのDNA 精製、例えば Diagenode 製のDiaPureカラムまたはフェノール-クロロホルム抽出に続いてエタノール沈殿）も使用することができます。

NOTE: キットを初めて使用する前に、等容量のイソプロパノールを加えてWash Buffer 1 とWash Buffer 2を調製します。Wash Buffer 1 と2は4 °Cで保存してください。蒸発を避けるために、保管中はボトルを開けたままにしないでください。

8. **2 µl** の **carrier** をサンプルに加えます。
9. **108 µl** の **100% isopropanol** をサンプルに加えます。

NOTE: イソプロパノールの添加後、溶液は濁ることがあります。これは実験に有害ではなく、精製されたDNAの品質や量には影響しません。

10. ボルテックスでIPure beads v2を再懸濁し、サンプルに**20µl**加えます。
11. DiaMag Rotatorで室温で**10分間**サンプルをインキュベートします。
12. チューブを軽くスピンドウンさせ、磁気ラックDiaMag1.5にセットし、**1分**待ってバッファーを捨てます。
13. チューブあたり**100µl**の**Wash Buffer 1**を加えます。ビーズペレットが完全に再懸濁するまで、チューブを閉じてよくボルテックスする。室温で30秒間インキュベートした後、チューブを軽くスピンドウンさせ、DiaMag1.5磁気ラックにセットし**1分**待ってバッファーを捨てます。

14. チューブあたり **100 μ l**の **Wash Buffer 2**を加えます。ビーズペレットが完全に再懸濁するまで、チューブを閉じてよくボルテックスします。室温で**30秒間**インキュベートし、チューブを軽くスピンドウンさせてDiaMag 1.5磁気ラックにセットし、**1分**待ってバッファーを捨てます。
15. チューブを再びスピンドウンさせ、DiaMag1.5に置きます。必要に応じて残りのWash Buffer 2を捨てます。ビーズペレットを**25 μ l**の **buffer C**に再懸濁し、室温で**15分間**、DiaMag Rotatorでインキュベートします。
16. チューブをスピンドウンさせてDiaMag 1.5にセットし、**1分**待って上清を新しい1.5 mlチューブに移します。ビーズは捨ててください。

フラグメントサイズアセスメント

精製DNAを1.5%アガロースゲルで分析します。最適な分離および可視化のために約300ngのDNAをロードします。または、フラグメントアナライザー（標準感度NGSフラグメント分析キット（DNF-473））を使用することもできます。



FAQ

IP後に沈殿するDNA量はどれくらいですか？

沈殿するDNAの量は、使用する抗体と細胞の種類によって大きく異なります。一般に、ヒストン修飾に対する抗体は、他の標的に対する抗体よりも多くの量のDNAを沈殿させます。CTCF抗体の場合、その量は4百万個のHeLa細胞から約20ngです。転写因子の典型的な収量は、1～5ngの範囲内であると推定されています。

転写因子以外のタンパク質に本キットを使用できますか？

本キットは、転写因子、ヒストン修飾酵素およびその他のクロマチン関連タンパク質を含むすべての非ヒストンタンパク質を対象としています。

付属のコントロールCTCF抗体はマウスと互換性がありますか？

含まれる対照CTCF抗体は、ウサギにおいてヒトCTCFに対して産生されていますが、マウスおよびラットにも互換性があります。

付属のコントロールプライマーはマウスと互換性がありますか？

含まれるコントロールプライマーはヒトDNA配列に特異的であり、他の種からのDNAに対しては機能しません。

1IPにつきどれくらいの量の抗体が必要ですか？

必要とされる抗体の量は、抗体自身に依存します。Diagenode ChIPグレードの抗体のほとんどは、最適な量を決定するために異なる濃度で試験されており、抗体の推奨量はデータシートに記載されています。ただし、これはアッセイに依存する可能性があり、実験設定ごとに最適化する必要があるかもしれないことに注意してください。抗体が他の会社の抗体である場合は、対応する技術データシートを参照してください。必要量の抗体が与えられない場合は、滴定実験を行うことを推奨します。最も低いバックグラウンドシグナルを与える抗体の量を選択することが重要です。

DiaMag Protein A-coated magnetic beads の結合能力はどれくらいですか？

30µlのビーズで、10µgまでの抗体に結合することができます。

Protein A-coatedビーズは何に特異性がありますか？

ウサギ、モルモット、イヌおよびブタのポリクローナルおよびモノクローナル抗体、マウスIgG2a、IgG2bおよびIgAならびにヒトIgG1、IgG2およびIgG4を効率的に捕捉します。 目的の抗体が異なるクラスの免疫グロブリン（マウスIgG1およびIgG3、ラットまたはヤギポリクローナルAbおよびヒトIgG3）に属する場合、プロテインAでコーティングしたビーズの代わりにDiaMagプロテインGコーティング磁性ビーズを使用する必要があります。これらのビーズは別売です（C03010021）。

ChIP実験にモノクローナル抗体を使うことができますか？

ChIPは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかを用いて行うことができます。一般に、ポリクローナル抗体集団は、単一エピトープを認識するモノクローナル抗体とは対照的に、多数の異なるエピトープを認識するでしょう。モノクローナルは標的タンパク質上の単一のエピトープを認識するので、高レベルの特異性、低い非特異的結合および低いバックグラウンドシグナルを提供することが多いです。モノクローナル抗体の主な欠点は、1つのエピトープのみの認識であり、これは架橋によって隠蔽され、免疫沈降の効率を低下させます。

なぜアガロースゲルとバイオアナライザーで異なる**DNA**サイズの断片化クロマチンが観察されるのですか？

断片化クロマチンの正確なサイズ評価には、アガロースゲルまたはフラグメントアナライザー（Advanced Analytical）の使用を推奨します。

Agilent BioAnalyzer 2100はNGSのライブラリー作製前にDNA断片のサイズ評価に広く使用されていますが、この技術は断片化クロマチンの分析にはあまり適していません。例えば、アガロースゲルとBioAnalyzer 2100プロファイルの間にいくつかの不一致が記録されています。それはマイクロ流体チップが残留分子（イオン、SDS、タンパク質、DNA沈殿などに使用される担体等）に対して反応性が高いこと、オーバーロード、もしくは、固定反応および脱架橋で完全には緩和されていないDNA分子の構造/空間構造が関係している可能性も考えられます。



更に、BioAnalyzer 2100のトレースはログに基づいているため、大きな分子量のフラグメントの分布は、小さなサイズのフラグメントと比較してトレースのより小さな領域に圧縮され、フラグメント分布の視覚的誤解を招きます。

別の重要なポイントは、BioAnalyzer 2100ピークの定量に関するものです。特定の範囲内の分子数を表すモル濃度を用いて各領域を計算すると、低分子量領域ではかなり高いレベルの分子が見出されます（下記の図を参照）。

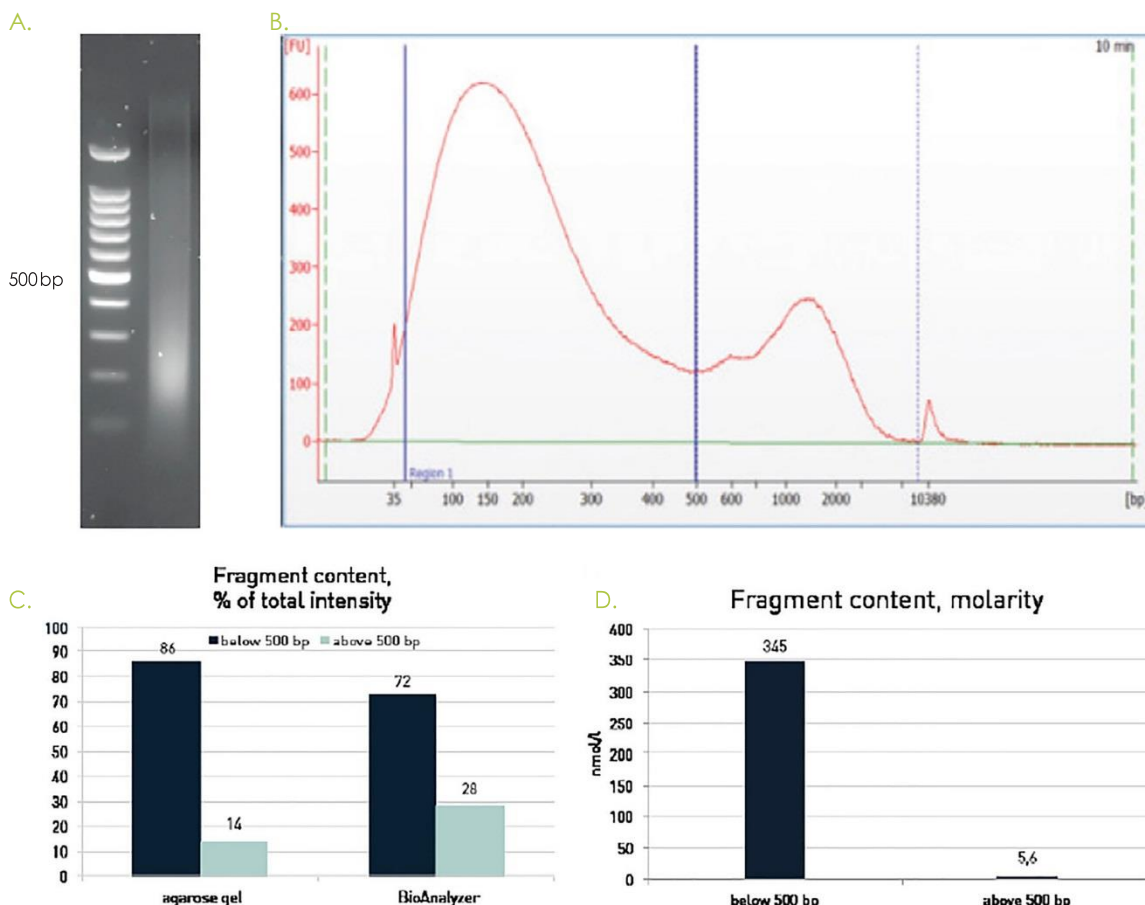


Figure 5. アガロースゲルおよびBioAnalyzerを用いた断片化クロマチンのサイズ評価。

HeLa細胞をホルムアルデヒドで固定し、染色体をDiagenodeのプロトコルに従って調製した。サンプルを、Picoruptorの30サイクルON / 30秒OFFで1.5 ml Picoruptor Microtubes with Caps (C30010016) を用いて超音波処理し、アガロースゲルA)、またはBioAnalyzer、High Sens Agilent DNA キット（パネルB）によって測定した。500bp以下および500bp超のフラグメント含有量を全表面積のパーセンテージとして算出した（パネルC）。パネルDはモル濃度として計算されたフラグメント含有量を示す（BioAnalyzerトレースのみ）。

キットに含まれる緩衝液の組成は何ですか？

バッファーの構成は独占的です。

関連製品

製品	製品番号	容量
ChIP Cross-link Gold	C01019027	600 µl
Chromatin shearing optimization kit – Low SDS (iDeal Kit for TFs)	C01020013	100 million cells
Chromatin shearing optimization kit - Low SDS (iDeal Kit for Histones)	C01020010	100 million cells
MicroPlex Library Preparation Kit v2 (12 indices)	C05010012	12 rxns
MicroPlex Library Preparation Kit v2 (12 indices)	C05010013	48 rxns
MicroPlex Library Preparation Kit v2 (48 indices)	C05010014	48 rxns
iDeal ChIP-seq kit for Histones	C01010050	10 rxns
iDeal ChIP-seq kit for Histones	C01010051	24 rxns
iDeal ChIP-seq kit for Histones	C01010059	100 rxns
iDeal Library Preparation Kit x24 (incl. Index Primer Set 1)	C05010020	24 rxns
IPure kit v2	C03010014	24 rxns
IPure kit v2	C03010015	100 rxns
Picoruptor	B01060001	

妥当性の確認された抗体 - www.diagenode.comで完全なリストをご覧ください

ChIP-seq grade 抗体	製品番号
AML1-ETO polyclonal antibody	C15310197
CBFb polyclonal antibody	C15310002
CTCF polyclonal antibody	C15410210
E2F6 polyclonal antibody	C15410314
ERalpha monoclonal antibody	C15100066
ETO polyclonal antibody	C15310001
FOXA1 polyclonal antibody	C15410231
FOXM1 polyclonal antibody	C15410232
GR monoclonal antibody	C15200010
GTF2E2 polyclonal antibody	C15410264
NF-E2 polyclonal antibody	C15410240
NFKB p65 polyclonal antibody	C15310256

ChIP-seq grade 抗体	製品番号
OCT4 polyclonal antibody	C15410305
p53 polyclonal antibody	C15410083
Pol II monoclonal antibody	C15200004
Pol II S2p monoclonal antibody	C15200005
Pol II S5p monoclonal antibody	C15200007
RARA polyclonal antibody	C15310155
TAL1 monoclonal antibody	C15200012
TARDBP polyclonal antibody	C15410266
TBP monoclonal antibody	C15200002
ZHX2 polyclonal antibody	C15410260
ZMYM3 monoclonal antibody	C15200016

研究用途のみに使用してください。

いかなる動物またはヒトの治療または診断用途にも使用しないでください。

©2017 Diagenode SA。全著作権所有。本書のいかなる部分も、電子的、機械的、磁氣的、光学的、化学的、手動、またはその他の方法で複製、送信、転載、検索システムへの保存、または任意の言語またはコンピュータ言語への翻訳を禁じます。Diagenode SA（以下、「Diagenode」という）の書面による事前の許可なく行うことはできません。このガイドの情報は予告なしに変更されることがあります。Diagenodeおよびその関連会社は、最新の技術開発を組み込むために、いつでも製品およびサービスを変更する権利を留保します。本ガイドは、正確性を保証するためのあらゆる予防措置を講じていますが、Diagenodeおよびそのアフィリエイトは、間違いや不作為、またはこの情報の適用または使用に起因するいかなる損害についても責任を負うものではありません。Diagenodeは、改善のための訂正や提案に対する顧客の意見を歓迎します。

NOTICE TO PURCHASER LIMITED LICENSE

The information provided herein is owned by Diagenode and/or its affiliates. Subject to the terms and conditions that govern your use of such products and information, Diagenode and/or its affiliates grant you a nonexclusive, non-transferable, non-sublicensable license to use such products and information only in accordance with the manuals and written instructions provided by Diagenode and/or its affiliates. You understand and agree that except as expressly set forth in the terms and conditions governing your use of such products, that no right or license to any patent or other intellectual property owned or licensable by Diagenode and/or its affiliates is conveyed or implied by providing these products. In particular, no right or license is conveyed or implied to use these products in combination with any product not provided or licensed to you by Diagenode and/or its affiliates for such use. Limited Use Label License: Research Use Only The purchase of this product conveys to the purchaser the limited, non-transferable right to use the product only to perform internal research for the sole benefit of the purchaser. No right to resell this product or any of its components is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for internal research purposes only and is not for use in commercial applications of any kind, including, without limitation, quality control and commercial services such as reporting the results of purchaser's activities for a fee or other form of consideration. For information on obtaining additional rights, please contact info@diagenode.com.

TRADEMARKS

The trademarks mentioned herein are the property of Diagenode or their respective owners. Bioanalyzer is a trademark of Agilent Technologies, Inc. Agencourt and AMPure® are registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. Illumina® is a registered trademark of Illumina® Inc; Qubit is a registered trademark of Life Technologies Corporation.



www.diagenode.com